

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/11, 15/55, 9/22, A61K 31/70</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 98/05770</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 12. Februar 1998 (12.02.98)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE97/01691 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 5. August 1997 (05.08.97)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 31 919.6      7. August 1996 (07.08.96)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WERNER, Dieter [DE/DE]; Neuer Weg 22, D-69118 Heidelberg (DE). GRANZOW, Christof [DE/DE]; Angelweg 16, D-69121 Heidelberg (DE). JOSWIG, Gaby [DE/DE]; Max-Josef-Strasse 21, D-68167 Mannheim (DE). ROTHBARTH, Karsten [DE/DE]; Im Brünnel 20, D-69493 Dossenheim (DE). SCHUBERT, Marie [DE/DE]; Husarenstrasse 16, D-69121 Heidelberg (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(54) Title:</b> ANTISENSE RNA WITH A SECONDARY STRUCTURE  <b>(54) Bezeichnung:</b> ANTI-SINN-RNA MIT SEKUNDÄRSTRUKTUR  <b>(57) Abstract</b>  An antisense RNA with special secondary structures is disclosed, as well as a combination of the antisense RNA and of a (ds)RNase. The antisense RNA and its combination may be used to inhibit gene expression.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die vorliegende Erfindung betrifft eine Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen sowie eine Kombination umfassend die Anti-Sinn-RNA und eine (ds)RNase. Die Anti-Sinn-RNA und die Kombination können zur Hemmung der Genexpression verwendet werden.		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Anti-Sinn-RNA mit S kundärstruktur

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur, eine sie enthaltende Kombination sowie die Verwendung beider.

5 Neue Techniken zur Hemmung der Genexpression umfassen häufig den Einsatz von Anti-Sinn-RNA. Dies ist eine RNA, die zu Bereichen der mRNA eines Gens komplementär ist und an diese bindet. Es entsteht ein Duplexmolekül, das der Translation der mRNA entzogen ist. Damit kann eine Hemmung der Genexpression erreicht werden.

10 Es hat sich allerdings gezeigt, daß das Duplexmolekül häufig nicht stabil ist, d.h. die mRNA wird wieder frei für die Translation, wodurch die Hemmung der Genexpression schwach ist oder gar nicht eintritt.

15 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem eine starke Hemmung der Genexpression erzielt werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch eine Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen erreicht.

20 Mit dem Ausdruck "besonderer Sekundärdruck" ist gemeint, daß es sich nicht um eine natürlich vorkommende Sekundärstruktur handelt, sondern daß diese künstlich erzeugt worden ist.

25 Der Ausdruck "Anti-Sinn-RNA" umfaßt jegliches RNA-Molekül, das sich als Anti-Sinn-RNA eignet, d.h. komplementär zu Bereichen einer RNA, insbesondere mRNA und ganz besonders Regulationselementen dieser, ist und durch Bindung an diese Bereiche eine Hemmung der Genexpression bewirkt. Die Anti-Sinn-RNA kann auch DNA-Sequenzen umfassen. Ferner kann die Anti-Sinn-RNA als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegen. Ein solcher Vektor kann

ein üblicher Expressionsvektor sein. Günstig kann es sein, wenn die Expression der für die Anti-Sinn-RNA kodierenden Sequenz unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors, wie eines Gewebe- oder Tumor-spezifischen Promotors, steht.

5

Der Ausdruck "Sekundärstruktur" umfaßt jegliche DNA- und/oder RNA-Sequenz, die in einer Anti-Sinn-RNA vorliegen kann und eine zumindest teilweise "Hairpin"-Struktur aufweist, d.h. einzelne Basenpaare unterliegen einer Rückfaltung. Die Sekundärstruktur kann innerhalb der Anti-Sinn-RNA vorliegen. Auch kann sie am 5'- und/oder 3'-Ende der Anti-Sinn-RNA vorliegen. Liegen mehrere Sekundärstrukturen vor, können diese gleich oder verschieden voneinander sein. Vorzugsweise ist die Sekundärstruktur eine  $(GC)_n$ -Palindrom- $(GC)_n$ -,  $(AT)_n$ -Palindrom- $(AT)_n$ -, oder  $(CG)_n$ -Palindrom- $(CG)_n$ -Sequenz, wobei es besonders bevorzugt ist, wenn  $n = 20$  und das Palindrom eine EcoRI-Restriktionsstelle ist. Bevorzugt sind auch komplizierte Palindrome wie  $(AGCT)_n$  oder  $(GAATTC)_n$ .

10

15

Eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist es, durch Oligonukleotidsynthese eine doppelsträngige  $(GC)_{20}$ -EcoRI- $(GC)_{20}$ -Sequenz herzustellen und diese an das 5'-Ende der cDNA-Sequenz eines zu hemmenden Gens zu ligieren. Das erhaltene DNA-Molekül wird in 3' → 5' Richtung an den Promotor eines Vektors ligiert. Der erhaltene Vektor führt zur Expression der erfindungsgemäßen Anti-Sinn-RNA. Ergänzend wird auf Sambrook, Fritsch, Maniatis, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, verwiesen.

20

25

Eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA kann als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors in Zellen eingebracht werden. Die Zellen können jegliche Zellen, wie Pflanzen- und tierische, insbesondere Säugetier- und ganz besonders menschliche Zellen, sein. Die Zellen können innerhalb eines Organismus oder außerhalb eines solchen vorliegen. Letztere können frisch isoliert oder in Kultur gehalten sein. Das Einbringen der Anti-Sinn-RNA in die Zellen kann durch übliche Transfektionstechniken, wie Elektroporation, erfolgen.

30

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Kombination aus einer erfindungsgemäßen Anti-Sinn-RNA und einer (ds)RNase. Dies ist eine RNase, die doppelsträngige RNA erkennen und abbauen kann. Eine (ds)RNase findet sich z.B. in dem Hefestamm *Schizosaccharomyces pombe* (pac 1 +). In der Kombination kann die erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegen. Ebenso kann die (ds)RNase als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegen. Ein solcher Vektor kann ein üblicher Expressionsvektor sein. Günstig kann es sein, wenn die Expression der für die (ds)RNase kodierenden Sequenz unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors, wie eines Gewebe- oder Tumor-spezifischen Promotors, steht. Ferner kann es von Vorteil sein, wenn die Kombination darin besteht, daß ein Vektor vorliegt, der sowohl für die erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA als auch für die (ds)RNase kodiert. Hinsichtlich des Vektors wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die Kombination aus einer erfindungsgemäßen Anti-Sinn-RNA und einer (ds)RNase kann in Zellen eingebracht werden. Hinsichtlich der Zellen und des Einbringens der Anti-Sinn-RNA wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Die (ds)RNase kann als solche, d.h. als Protein, durch übliche Verfahren, wie Lipofektion, eingebracht werden. In Form eines sie kodierenden Vektors kann die (ds)RNase durch Verfahren eingebracht werden, wie sie für die Anti-Sinn-RNA genannt wurden.

Die vorliegende Erfindung stellt eine Anti-Sinn-RNA und eine sie enthaltende Kombination bereit, die eine starke Hemmung der Genexpression bewirken. Die vorliegende Erfindung findet somit eine breite Anwendung in der Molekularbiologie und der Medizin. Insbesondere kann an die Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen gedacht werden, bei denen einzelne Proteine auslösend oder verstärkend sind. Dies sind z.B. Erkrankungen, bei denen Hormone eine große Rolle spielen, Tumorerkrankungen und virale Infektionen, wie HIV und AIDS.

**Kurze Beschreibung der Zeichnung**

Fig. 1 zeigt die Hemmung der Genexpression durch eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA. (1) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA. (2) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur I. (3) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur II.

Fig. 2 zeigt die Hemmung der Genexpression durch eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA. (1) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur I. (2) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur I und einer (ds)RNase.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

**Beispiel 1: Herstellung von Expressions-Vektoren, die das Chloramphenicolacetyltransferase (CAT)-Gen in 5'→3' bzw. 3'→5' Richtung enthalten.**

Das CAT-Gen wurde aus einem üblichen CAT-Vektor isoliert und in die "multiple cloning site" des Expressionsvektors pJ3Ω (vgl. Nucleic acids res. 18, (1990), 1068) inseriert. In einem Fall erfolgte die Insertion in 5'→3' Richtung und es wurde der Expressionsvektor pJ3Ω-CAT erhalten. Im anderen Fall erfolgte die Insertion in 3'→5' Richtung und es wurde der Expressionsvektor pJ3Ω-TAC erhalten.

**Beispiel 2:** Herstellung von Expressionsvektoren, die das CAT-Gen in 3'→ 5' Richtung und eine für eine Sekundärstruktur I bzw. II kodierende Sequenz enthalten.

5 (A) Expressionsvektor mit einer (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub>-Sequenz am 5'-Ende des CAT-Gens (Sekundärstruktur I)

1. Herstellung einer (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub>-Sequenz.

10 (a) Mittels eines automatischen Synthese-Geräts (Oligonukleotid-Synthesizer) wurden 2 Oligodesoxynukleotide hergestellt:

AATTC- (GC)<sub>20</sub>-G  
und  
G- (GC)<sub>20</sub>-CTTAA

(b) Die beiden Oligodesoxynukleotide wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, auf 90°C erhitzt, danach langsam unter "annealing"-Bedingungen auf Raumtemperatur abgekühlt. Dabei entstand ein DNA Dopplestrang folgender Struktur:

AATTC-(GC)<sub>20</sub>-G  
\*   \* \*   \*  
G-(GC)<sub>20</sub>-CTTAA

25 (c) Unter Ligationsbedingungen entstanden Vielfache der in (b) beschriebenen DNA

AATTC-(GC)<sub>20</sub>-GAATTC-(GC)<sub>20</sub>-GAATTC-(GC)<sub>20</sub>-G....  
 \*    \*\*        \*        \*        \*        \*  
 G-(GC)<sub>20</sub>-CTTAAG-(GC)<sub>20</sub>-CTTAAG-(GC)<sub>20</sub>-CTTAA...

(d) Die Ligationsprodukte wurden durch Gelelektrophorese nach

Größe aufgetrennt und eine Sequenz, bestehend aus Dimeren, wurde aus dem Gel eluiert und mittels Polynukleotidkinase /ATP phosphoryliert.

5                    AATTC-(GC)<sub>20</sub>-GAATTC-(GC)<sub>20</sub>-G-P  
                     \*     \*\*                  \*\*\*\*\*      \*\*           \*  
                     P-G-(GC)<sub>20</sub>-CTTAAG-(GC)<sub>20</sub>-C

10 (e) Diese Sequenz wurde zunächst in die EcoRI-Stelle des üblichen Klonierungsvektors pBluescript (Stratagene) eingesetzt, aus dem sie durch geeignete Restriktionsenzyme zur Umklonierung in den Vektor, der das CAT-Gen in 3' → 5' Richtung aufweist, entnommen werden konnte.

2. Einbau der (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub> Sequenz in den Vektor, der das CAT-Gen in 3'→ 5' Richtung aufweist.

Der Vektor pJ3Q-TAC von Beispiel 1 wurde in der "multiple cloning site" zwischen dem Promotor und der TAC-Insertion mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten. Die (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub> Sequenz wurde mit den entsprechenden Enzymen aus dem pBluescript-Vektor von Beispiel 2(e) entnommen. Die beiden Nukleinsäuren wurden per Ligation verbunden. Es wurde der Expressionsvektor pJ3Q-TAC-Sek. 1 erhalten.

25 (B) Expressionsvektor mit einer (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub>-Sequenz am 3'-Ende des CAT-Gens (Sekundärstruktur II).

Die unter Beispiel 2 (A) hergestellte (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub>-Sequenz wurde in den Vektor pJ3Q-TAC am 3'-Ende des TAC-Gens eingesetzt. Es wurde der Expressionsvektor pJ3Q-TAC-Sek.II erhalten.



**Beispiel 3: Herstellung eines Expressionsvektors, der für eine (ds) RNAs kodiert.**

5 Aus einer üblichen genomischen Bibliothek von Schizosaccharomyces pombe wurde mittels einer PCR-Amplifikation das für eine (ds)RNase kodierende Gen (pac1 +) isoliert. Hierzu wurden Primer verwendet, die aus der bekannten Sequenz des Gens pac1 + (vgl. Datenbank: embl: S78982) abgeleitet worden waren. Das Gen pac1 + wurde in dem bekannten Vektor pBluescript kloniert und  
10 durch Sequenzierung bestätigt. Nach Umklonierung in den üblichen Expressionsvektor pcDNA3 (InVitrogen) wurde der Expressionsvektor pcDNA3-pac1 + erhalten.

**Beispiel 4: Hemmung der Genexpression durch eine Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur**

15 (a) Ehrlich Ascites Tumorzellen ( $10^7$  Zellen/ml) wurden mit den Expressionsvektoren pJ3 $\Omega$ -CAT, pJ3 $\Omega$ -TAC, pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. I bzw. pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. II transfiziert (vgl. Tabelle 1). Die  
20 Transfektion wurde mittels Elektroporation (366V/950 $\mu$ F/Elektrodenabstand D = 4mm) durchgeführt. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und Aliquote mit radioaktiv markiertem Chloramphenicol inkubiert. Es wurde  
25 die Konversionsrate (in Ac-, Di-Ac-Chloramphenicol) nach DC durch Messung der Radioaktivität bestimmt.

- 8 -

**Tabell 1:**

	1	2	3
pJ3 $\Omega$ -CAT	3 $\mu$ g	3 $\mu$ g	3 $\mu$ g
pJ3 $\Omega$ -TAC	7,5 $\mu$ g	-	-
pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. I	-	7,5 $\mu$ g	-
pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. II	-	-	7,5 $\mu$ g

Aus Fig. 1 geht hervor, daß durch Transfektion von pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. I bzw. pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. II (vgl. Fig. 1, (2), (3)) eine stärkere Hemmung der Expression des CAT-Gens erreicht werden kann, als wenn pJ3 $\Omega$ -TAC (vgl. Fig. 1, (1)) verwendet wird.

(b) Ehrlich Ascites Tumorzellen ( $10^7$  Zellen/ml) wurden mit den Expressionsvektoren pJ3 $\Omega$ -CAT, pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. I bzw. pcDNA3-pac1 + transfiziert (vgl. Tabelle 2). Die Transfektionsbedingungen waren wie in Beispiel 4 (a) beschrieben.

**Tabelle 2:**

	1	2
pJ3 $\Omega$ -CAT	5 $\mu$ g	5 $\mu$ g
pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. I	10 $\mu$ g	10 $\mu$ g
pcDNA3-pac1 +	-	10 $\mu$ g

Aus Fig. 2 geht hervor, daß durch Kotransfektion von pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. I mit pcDNA3-pac1 + (vgl. Fig. 2 (2)) eine stärkere Hemmung der Expression von CAT erhalten wird, als wenn pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. I (vgl. Fig. 2, (1)) alleine verwendet wird.

5

Somit wird deutlich, daß eine Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur eine größere Hemmwirkung auf die Genexpression hat als eine Anti-Sinn-RNA ohne Sekundärstruktur. Ferner wird deutlich, daß die Hemmwirkung der Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur noch gesteigert werden kann, wenn zusätzlich zu gegebenenfalls natürlich vorhandenen (ds)RNAsen eine (ds)RNase-Aktivität mittels der beschriebenen Verfahren hervorgerufen bzw. erzeugt wird.

**Patentansprüche**

1. Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen.
2. Anti-Sinn-RNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Sekundärstruktur am 5'- und/oder 3'-Ende der Anti-Sinn-RNA geschaffen worden ist.
3. Anti-Sinn-RNA nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Sekundärstruktur eine  $(GC)_n$ -Palindrom- $(GC)_n$ - oder  $(CG)_n$ -Palindrom- $(CG)_n$ -Sequenz ist.
4. Anti-Sinn-RNA nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß  $n = 20$  und das Palindrom eine EcoRI-Restriktionsstelle ist.
5. Anti-Sinn-RNA nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Anti-Sinn-RNA durch einen Vektor kodiert ist.
6. Kombination, umfassend die Anti-Sinn-RNA nach einem der Ansprüche 1-5 und eine (ds)RNase.
7. Kombination nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Anti-Sinn-RNA und die (ds)RNase durch einen oder mehrere Vektoren kodiert sind.
8. Verwendung der Anti-Sinn-RNA nach einem der Ansprüche 1-5 und der Kombination nach Anspruch 6 oder 7 zur Hemmung der Genexpression.

1/2

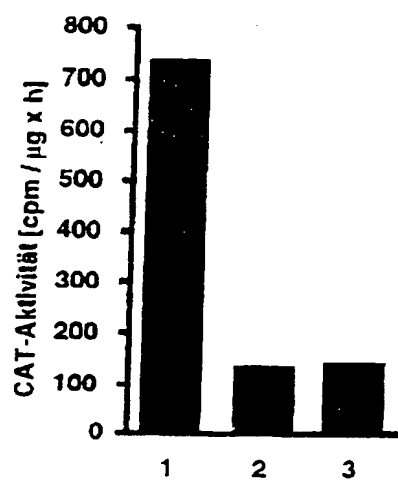


Fig. 1

2/2

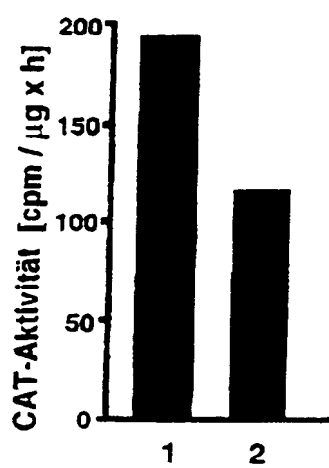


Fig. 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE97/01691

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
See supplemental sheet additional matter PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DE 97/01691

Note: Although claim 8 (as far as a in vivo procedure is concerned) refers to a treatment procedure to be applied to a human/animal body, the search was made based on the given effects of the compound concerned.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

National Application No

PCT/DE 97/01691

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9423026 A	13-10-94	FR 2703053 A AU 6432094 A	30-09-94 24-10-94
WO 9510607 A	20-04-95	AU 8016494 A CA 2173361 A EP 0804563 A US 5624803 A	04-05-95 20-04-95 05-11-97 29-04-97
WO 9401550 A	20-01-94	AU 4770093 A CA 2139319 A CZ 9403332 A EP 0649467 A FI 946201 A HU 69981 A JP 8501928 T NO 945020 A NZ 255028 A PL 307025 A	31-01-94 20-01-94 12-07-95 26-04-95 30-12-94 28-09-95 05-03-96 28-02-95 24-03-97 02-05-95
WO 9219732 A	12-11-92	FR 2675803 A AU 660679 B AU 1759692 A CA 2102229 A EP 0581848 A JP 6506834 T	30-10-92 06-07-95 21-12-92 26-10-92 09-02-94 04-08-94
EP 0592685 A	20-04-94	AU 3905893 A BR 9305489 A CA 2111565 A WO 9320686 A US 5491080 A	18-11-93 27-12-94 28-10-93 28-10-93 13-02-96

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/11 C12N15/55 C12N9/22 A61K31/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A61K C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 94 23026 A (GENSET ;VASSEUR MARC (FR); BLUMENFELD MARTA (FR); MEGUENNI SAID (F) 13.Oktober 1994 siehe Seite 7 - Seite 11, Zeile 4	1-3,8
Y	siehe Ansprüche siehe Abbildungen	6-8
Y	HELENE C ET AL: "LA STRATEGIE ANTISENS: NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES " MEDECINE SCIENCES, Bd. 10, Nr. 3, 1.März 1994, Seiten 253-273, XP000576223 siehe Seite 254, rechte Spalte, Absatz 2 - Seite 258, linke Spalte, Zeile 21 siehe Seite 271, linke Spalte, Zeile 35 - rechte Spalte, Zeile 26 -/-	6-8



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Januar 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11.02.98

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Andres, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 10607 A (UNIV CALIFORNIA ;NOONBERG SARAH H (US); HUNT ANTHONY C (US)) 20.April 1995 siehe Seite 24, Zeile 28 - Seite 33, Zeile 20 ---	1,2,5,8
X	WO 94 01550 A (HYBRIDON INC ;AGRAWAL SUDHIR (US); TANG JIN YAN (US)) 20.Januar 1994 siehe Seite 5 - Seite 6 siehe Seite 13, Zeile 25 - Seite 15, Zeile 30 siehe Beispiele siehe Abbildungen 1,5 ---	1,2,8
X	WO 92 19732 A (GENSET) 12.November 1992 siehe Seite 9, Zeile 10 - Seite 11, Zeile 28 siehe Seite 17, Zeile 23 - Zeile 32 siehe Seite 24, Zeile 35 - Seite 25, Zeile 33 siehe Seite 30, Zeile 20 - Seite 34, Zeile 16 ---	1,2,8
A	URATA, H. ET AL.: "NMR study of a heterochiral DNA: stable Watson-Crick-type base-pairing between the enantiomeric residues" J. AM. CHEM. SOC. (1993), 115, 9852-3 , XP002052970 siehe das ganze Dokument ---	3,4
A	EP 0 592 685 A (KIRIN BREWERY) 20.April 1994 siehe das ganze Dokument ---	6-8
A	NELLEN, W. & LICHTENSTEIN, C.: "WHAT MAKES AN MESSENGER-RNA ANTI-SENSE-ITIVE ?" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, (NOV 1993) VOL. 18, NO. 11, PP. 419-423., XP002049385 siehe Seite 421, mittlere Spalte, letzter Absatz - Seite 422, linke Spalte, Zeile 8 ---	6-8
A	ROTONDO, G. & FREDEWEY, D.: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE PAC1 RIBONUCLEASE OF SCHIZOSACCHAROMYCES-POMBE" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (15 JUN 1996) VOL. 24, NO. 12, PP. 2377-2386., XP002049388 -----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 97/01691

## Feld I Bemerkung n zu den Ansprüchen, di sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,  
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung : Obwohl Anspruch 8 (soweit es sich um ein In Vivo Verfahren handelt) sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/01691

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9423026 A	13-10-94	FR 2703053 A AU 6432094 A	30-09-94 24-10-94
WO 9510607 A	20-04-95	AU 8016494 A CA 2173361 A EP 0804563 A US 5624803 A	04-05-95 20-04-95 05-11-97 29-04-97
WO 9401550 A	20-01-94	AU 4770093 A CA 2139319 A CZ 9403332 A EP 0649467 A FI 946201 A HU 69981 A JP 8501928 T NO 945020 A NZ 255028 A PL 307025 A	31-01-94 20-01-94 12-07-95 26-04-95 30-12-94 28-09-95 05-03-96 28-02-95 24-03-97 02-05-95
WO 9219732 A	12-11-92	FR 2675803 A AU 660679 B AU 1759692 A CA 2102229 A EP 0581848 A JP 6506834 T	30-10-92 06-07-95 21-12-92 26-10-92 09-02-94 04-08-94
EP 0592685 A	20-04-94	AU 3905893 A BR 9305489 A CA 2111565 A WO 9320686 A US 5491080 A	18-11-93 27-12-94 28-10-93 28-10-93 13-02-96

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/DE 97/01691

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/11 C12N15/55 C12N9/22 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 23026 A (GENSET ;VASSEUR MARC (FR); BLUMENFELD MARTA (FR); MEGUENNI SAID (F) 13 October 1994 see page 7 - page 11, line 4	1-3,8
Y	see claims see figures	6-8
Y	HELENE C ET AL: "LA STRATEGIE ANTISENS: NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES " MEDECINE SCIENCES, vol. 10, no. 3, 1 March 1994, pages 253-273, XP000576223 see page 254, right-hand column, paragraph 2 - page 258, left-hand column, line 21 see page 271, left-hand column, line 35 - right-hand column, line 26	6-8

-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 1998

Date of mailing of the international search report

11.02.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 97/01691

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 10607 A (UNIV CALIFORNIA ;NOONBERG SARAH H (US); HUNT ANTHONY C (US)) 20 April 1995 see page 24, line 28 - page 33, line 20 ---	1,2,5,8
X	WO 94 01550 A (HYBRIDON INC ;AGRAWAL SUDHIR (US); TANG JIN YAN (US)) 20 January 1994 see page 5 - page 6 see page 13, line 25 - page 15, line 30 see examples see figures 1,5 ---	1,2,8
X	WO 92 19732 A (GENSET) 12 November 1992 see page 9, line 10 - page 11, line 28 see page 17, line 23 - line 32 see page 24, line 35 - page 25, line 33 see page 30, line 20 - page 34, line 16 ---	1,2,8
A	URATA, H. ET AL.: "NMR study of a heterochiral DNA: stable Watson-Crick-type base-pairing between the enantiomeric residues" J. AM. CHEM. SOC. (1993), 115, 9852-3 , XP002052970 see the whole document ---	3,4
A	EP 0 592 685 A (KIRIN BREWERY) 20 April 1994 see the whole document ---	6-8
A	NELLEN, W. & LICHTENSTEIN, C.: "WHAT MAKES AN MESSENGER-RNA ANTI-SENSE-ITIVE ?" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, (NOV 1993) VOL. 18, NO. 11, PP. 419-423., XP002049385 see page 421, middle column, last paragraph - page 422, left-hand column, line 8 ---	6-8
A	ROTONDO, G. & FREDEWEY, D.: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE PAC1 RIBONUCLEASE OF SCHIZOSACCHAROMYCES-POMBE" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (15 JUN 1996) VOL. 24, NO. 12, PP. 2377-2386., XP002049388 -----	